

DIE ZÜCHTUNG VON AMNIONZELLEN AUS DEM FRUCHTWASSER DER FRÜHSCHWANGERSCHAFT

**Experimentelle Untersuchungen zur pränatalen genetischen
Diagnostik mit besonderer Berücksichtigung
der Chromosomenpräparation**

Helena Margareta Götz

1975



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41551923_0090

AUS DER KINDERKLINIK DER UNIVERSITÄT MÜNCHEN

DIREKTOR: PROF. DR. H. SPIESS

DIE ZÜCHTUNG VON AMNIONZELLEN

AUS DEM FRUCHTWASSER DER FRÜHSCHWANGERSCHAFT.

Experimentelle Untersuchungen zur pränatalen genetischen
Diagnostik mit besonderer Berücksichtigung
der Chromosomenpräparation.

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin

verfaßt und

einer Hohen Medizinischen Fakultät

der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Helena Margareta G ö t z

aus München

München, 1 9 7 5



Mit Genehmigung der Universität M ü n c h e n

Berichterstatter : Priv.-Doz. Dr. J.-D. Murken

Mitberichterstatter : Prof. Dr. H. Spiess

Dekan: Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung : 18. Februar 1975

MEINER MUTTER

DIE ZÜCHTUNG VON AMNIONZELLEN AUS DEM FRUCHTWASSER DER FRÜHSCHWANGERSCHAFT.

Experimentelle Untersuchungen zur pränatalen genetischen Diagnostik mit besonderer Berücksichtigung der Chromosomenpräparation.

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG
2. LITERATURÜBERSICHT
3. PROBLEMSTELLUNG
4. EIGENE ERGEBNISSE
 - 4.1. Material und Methoden
 - 4.1.1. Variation der Fruchtwasserverarbeitung
 - 4.1.2. Variation der Kulturgefäße
 - 4.1.3. Variation der Medien
 - 4.1.4. Versuche zur frühzeitigen und verbesserten Chromosomenpräparation
 - 4.1.5. Beschreibung der modifizierten Methode
 - 4.2. Entwicklung und Anwendung der modifizierten Methode
 - 4.3. Beobachtungen zur Amnionzellzüchtung
 - 4.3.1. Fruchtwasser
 - 4.3.2. Zellwachstum
 - 4.3.3. Zytogenetik
5. DISKUSSION
6. ZUSAMMENFASSUNG
7. LITERATURVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG

Bis vor 20 Jahren waren Infektionskrankheiten und Ernährungsstörungen die mit Abstand häufigste Todesursache im Kindesalter. Seit Beginn der Antibiotika-Ära sind Infektionen zunehmend erfolgreich therapierbar. Auch gelang es, die Ernährungsprobleme weitgehend zu beherrschen, so daß beide Krankheitsgruppen für die kindliche Mortalität an Bedeutung verloren haben.

Die relative Häufigkeit der Kinder mit angeborenen Fehlbildungen ist dadurch stark angestiegen. Nach den Arbeiten von STEVENSON (1961) und ROBERTS et al. (1970) sind 42 % der Todesfälle in Kinderkliniken auf genetische Leiden zurückzuführen; insgesamt weisen 4 % der lebend geborenen Kinder angeborene Defekte auf. Dies erklärt die intensive Forschung auf dem Gebiet der vorgeburtlichen Diagnostik.

Bis vor wenigen Jahren lag die klinische Bedeutung der Fruchtwasseruntersuchung ausschließlich in der Erkennung des Morbus haemolyticus fetalis. Heute jedoch ist es möglich geworden, Geschlechtsbestimmungen und Chromosomenanalysen bereits pranatal an den im Fruchtwasser enthaltenen fetalen Zellen durchzuführen. Außerdem können angeborene Stoffwechselstörungen mit Hilfe der Amniozentese bereits in der frühen Gravidität nachgewiesen werden. Diese Untersuchungen erlauben, schon in einem frühen Stadium der intrauterinen Entwicklung, - 14.-18. Schwangerschaftswoche - genetisch bedingte Defekte des Feten aufzudecken oder auszuschließen.

Begünstigt wurde diese Entwicklung durch die zunehmende Erfahrung in der Amniozentese-technik und ihrer Anwendung auch in der Frühschwangerschaft, durch den Fortschritt auf dem Gebiet der Zellzüchtung mit der Möglichkeit der Fruchtwasser-Zellkultur, durch die wachsende Erkenntnis in der Pathophysiologie von hereditären Stoffwechselerkrankungen und schließlich durch die Entwicklung verfeinerter biochemischer Nachweismethoden.

Die antenatale Diagnostik fetaler Erkrankungen erstreckt sich auf alle vier aus teratogener Sicht unterscheidbare Gruppen von Mißbildungen :

1. Chromosomenanomalien (2-8 %)
2. monogen erbliche Mißbildungen (18-26 %)
3. X-chromosomal bedingte Krankheiten (10 %)
4. Polygen - multifaktoriell und exogen bedingte Mißbildungen (64-74 %)

SCRIVER (1972), ROBERT et al. (1970), STEVENSON (1961).

Eine präzise und individuelle Aussage über Chromosomenaberrationen, monogen und X - chromosomal bedingte Erb-leiden und damit eine befriedigende genetische Beratung kann nur mit Hilfe der erfolgreichen Züchtung und zytogenetischen oder biochemischen Untersuchung von Fruchtwasserzellen gewonnen werden.

Im Rahmen der genetischen Beratung an der Kinderpoliklinik München wurden die Arbeiten zum Aufbau der pränatalen ge-neti-

schen Diagnostik im Jahre 1971 begonnen. Die eigenen, hier dargestellten Untersuchungen zur Entwicklung einer standardisierten, leicht praktikablen Züchtungstechnik wurden 1971 aufgenommen.

Diese gegenüber bisherigen Veröffentlichungen modifizierte Technik der Zellzüchtung und Chromosomenpräparation soll in der vorliegenden Arbeit geschildert werden. Die dabei auftretenden Beobachtungen und Probleme werden beschrieben.

2. LITERATURÜBERSICHT

Schon gegen Ende des letzten Jahrhunderts war bekannt (ROBIN 1904), daß sich epidermoide Zellen im Fruchtwasser befinden. Dennoch untersuchte erst DANIEL in Paris 1904 systematisch die zytologischen Bestandteile der Amnionflüssigkeit. Als 1930 die transabdominale Amniozentese zum ersten Mal mit diagnostischem Ziel durchgeführt wurde (MENEES et al. 1930), wuchs in der Folgezeit die Erkenntnis, daß die Zellen wie auch die gelösten Bestandteile des Fruchtwassers Aussagen über den Zustand des Fetus ermöglichen. ROSA und FANARD beschrieben 1949 erstmals eine Methode der pranatalen Geschlechtsbestimmung durch zytologische Prüfung des Fruchtwassers in der 2. Schwangerschaftshälfte. Die Arbeiten von BARR und BERTRAM (1948) lösten 1955/56 eine Publikationsflut aus: WIEDEMANN (1955), FUCHS und RIIS (1956), MAKOWSKI et al. (1956), SERR et al. (1955), SHETTLES (1956) beobachteten das beschriebene Geschlechtschromatin auch in Fruchtwasserzellen. Für die Diagnose der X-chromosomal-rezessiv gebundenen Erkrankungen wie Haemophilie war diese Methode sehr wertvoll.

Trotz großer Fortschritte in der Zytogenetik waren die Versuche, Zellen aus Fruchtwasser zu züchten, spärlich und blieben lange ohne Erfolg. Erst 1961 kultivierten FUCHS und PHILIP zum ersten Mal erfolgreich Amnionzellen und zeigten sich überzeugt von der Möglichkeit, Karyogramme von fetalen Zellen anzufertigen. 1966 berichteten STEELE und BREG, THIEDE et al., angeregt durch die Mitteilungen von KLINGER (1966)

über die Kultivierung fetaler Amnionzellen; ihnen gelangen auch erstmals Chromosomenpräparationen. Es folgten detaillierte Beschreibungen von JAKOBSON und BARTER (1967), NADLER (1968 a), NADLER und GERBIE (1970).

HUGHES et al. (1972) und QUAYLE et al. (1972) gelang es, durch direkte Präparation aus nativen Fruchtwasserzellen fetale Chromosomen zu gewinnen, doch ist diese Methode für klinische Zwecke unbrauchbar (HAMERTON 1972). Ohne klinische Bedeutung ist auch die von WALKNOWSKA et al. (1969) beschriebene Methode, aus den immer im mütterlichen Blut vorhandenen fetalen Lymphozyten die Geschlechts- und Chromosomendiagnose zu stellen.

Neue Erkenntnisse beschleunigten den Fortschritt auch in der biochemischen Zellgenetik. Die Entwicklung erfolgte schrittweise von in-vivo-Studien über die Schilderung spezifischer Enzymdefekte in Zellkulturen zur Diagnostik biochemisch bedingter Erkrankungen an kultivierten Hautfibroblasten, Leukozyten und schließlich Amnionzellen, die während der Züchtung ihren genetisch determinierten biochemischen Phänotyp beibehalten. So konnten etwa 30 angeborene Stoffwechselstörungen, die an Fibroblasten nachgewiesen worden waren, auch pränatal erkannt werden.

Erste Ergebnisse bei der klinischen Anwendung der neuen diagnostischen Möglichkeiten zeigten sich in den Jahren 1967 und 1968. NADLER (1967) veröffentlichte den ersten Bericht über antenatal diagnostizierte Stoffwechselstörungen - Mucopolysaccharidose, Galactosaemie, Morbus Pompe. JAKOBSON und BARTER (1968) analysierten die Chromosomen eines Feten

mit erhöhtem Risiko - die Mutter war Trägerin einer D/D-Translokation - und fanden auch das Kind als D/D - Translokationsträger.

Im Folgenden sei kurz die von JAKOBSON und BARTER (1967) ausgearbeitete Standardmethode beschrieben, die zunächst eine Erfolgsrate von 38 % erzielte.

1 oder 2 ml Fruchtwasser werden in ein Leighton Tube oder eine T-10 Flasche überführt zusammen mit der gleichen Menge eines Kulturmediums, das angereichert ist mit 30 % fetalem Kälberserum. Dann folgt die Begasung mit 5%igem CO₂-Luftgemisch. Innerhalb von 24 Stunden setzen sich die Zellen auf 9 x 20 mm großen Deckgläsern fest, die vor Züchtungsbeginn in die Kulturgefäße implantiert wurden. Das Kulturmedium wird alle 2 bis 3 Tage erneuert.

Sobald die Kultur auf dem Deckglas ausgewachsen ist, wird durch Zugabe des Spindelgiftes Kolchizin (1 ug auf 10 ml für 3 - 6 Std.) die Zellteilung in der Metaphase blockiert. Es folgt die 15 min. dauernde hypotone Behandlung der Deckglaskultur in 0,7%igem Na-Citrat und die Fixierung in Methanol/Eisessig (3:1) 30 min. lang. Das Deckglas wird vorsichtig abgeflammt und mit 10%iger Giemsalösung gefärbt. Photographie und Analyse der Mitosen beenden die Untersuchung.

Diese Methode wurde inzwischen als standardisiert anerkannt und von allen Laboratorien, der eigenen Erfahrung entsprechend modifiziert, übernommen.

Die Mehrzahl der Variationen bezieht sich dabei auf die verwendeten Materialien. So unterscheiden sich die Kulturmedien von Labor zu Labor in ihrer Zusammensetzung und dem prozentualen Zusatz an fetalem Kälberserum. Von GRAY (1971) wird auch das homologe Fruchtwasser als Nährmedium beschrieben. Grundsätzlich scheint jedes Kulturmedium zur Züchtung von Amnionzellen geeignet (JAKOBSON und BARTER 1967), doch besteht in der Anwesenheit von fetalem Kälberserum eine notwendige Voraussetzung für das Zellwachstum (STEELE und BREG 1966).

Die verwendeten Kulturgefäße sind in Form, Größe und Material sehr verschieden. NADLER (1968) verwendet 30 mm Falcon¹ Petrischalen - ein offenes System - und inkubiert in CO₂ - Atmosphäre. GRAY (1971) nimmt Falcon Kulturflaschen von der Größe 22 x 22 mm, JAKOBSON (1967), CONCIENCE und SCHMID (1972) arbeiten mit Leighton-Tubes und T-10-Flaschen aus Glas. Geteilt sind die Ansichten über CO₂-Begasung bzw. CO₂-Inkubation der Kulturen. Einige Autoren befürworten CO₂-Inkubation (STEELE und BREG 1966, NADLER 1968), andere sehen darin keine Bedeutung für das Zellwachstum (JAKOBSON und BARTER 1967).

Weitere Modifikationen werden vom Zellansatz und der Chromosomenpräparation beschrieben. Im Gegensatz zu JAKOBSON (1967) zentrifugieren NADLER (1968), CONCIENCE (1972) das Fruchtwasser vor dem Ansatz und setzen nur die zellulären Bestandteile in Medium gelöst an.

Von der vielfach beschriebenen Methode der Chromosomenpräparation in Zellsuspension (SANTESSON et al. 1969, PRESCOTT et al. 1973, VALENTI et al. 1969, SPERLING und SALING 1970), wie

¹ Falcon: 1950 Williams Dr. Oxnard
CA. 93030 U.S.A.

sie von der peripheren Blutkultur bekannt ist, sind jetzt alle Autoren zu der von JAKOBSON (1967) angegebenen primären Deckglaskultur übergegangen. Bei dieser Präparationstechnik werden Fehldiagnosen auf Grund artefizieller Mosaik, Chromosomenverluste oder Beimischung mütterlicher Zellen weitgehend vermieden (NADLER 1973, SCHMID 1973).

Welche Erfolge die Amnionzellzüchtung von Anfang an hatte, zeigt der Bericht von NADLER (1972) über die Arbeit amerikanischer Laboratorien bis 1972 (Tab. 1). Aus den jüngsten Veröffentlichungen von MILUNSKY (1973) wird deutlich, wie mit zunehmender Erfahrung und Modifikation der Standardmethode in den einzelnen Laboratorien die Erfolgsquoten bis über 90 % gestiegen sind.

Autoren	Zahl der Kulturansätze 100%	erfolgreiche Kulturen	auswertbare Karyogramme
Steele und Breg 1966	52	23%	4%
Thiede et al. 1966	16	69%	19%
Jakobson et al. 1967	85	67%	67%
Nadler et al. 1970	160	97%	97%
Valenti et al. 1969	24	83%	71%
Emery et al. 1970	128	73%	50%
Buttler et al. 1970	56	95%	88%
Santesson et al. 1969	10	100%	100%
Lisgar et al. 1970	21	90%	90%
Gregson 1970	22	86%	86%
Gray et al. 1971	40	100%	100%
Total	558	73%	66%

Tab. 1: Züchtung und Chromosomenpräparation fetaler Amniozellen - Erfolgsszahlen verschiedener Laboratorien.

3. PROBLEMSTELLUNG

Da sich die in der Literaturübersicht beschriebene Methode in unserem Labor als zunächst nicht reproduzierbar erwies, begannen wir 1971 mit der Entwicklung einer eigenen modifizierten Technik der Amnionzellzüchtung und Chromosomenpräparation. Dabei wurde besonders darauf Wert gelegt, daß dieses Verfahren durch einfache und rasche Durchführbarkeit, Zuverlässigkeit sowie präzise Aussage als Routinemethode für die pränatale Diagnostik von Chromosomenaberrationen geeignet ist.

Es zeigte sich dabei, daß für den Erfolg oder Mißerfolg eines Züchtungsversuches oft zunächst nicht objektivierbare Gründe entscheidend waren. Daher mußten Technik und Material variiert werden, bis diese Faktoren erkannt und ausgeschaltet werden konnten. Somit fand man zu einer für unser Labor geltenden Standardmethode. Durch genaue Beobachtung des Zellwachstums sollte Aufschluß gewonnen werden über Identität der verschiedenen Zellarten, Morphologie und Verhalten der Zellen während der Züchtung.

4. EIGENE ERGEBNISSE

In 13 Vorversuchen wurde nach der Methode von NADLER (1968) gearbeitet:

Wir zentrifugierten das Fruchtwasser 10-12 Minuten lang bei 800 - 1200 Umdrehungen/min., setzten das Sediment in Falcon¹ Petrischalen (Durchmesser 3 cm) an und inkubierten bei 5%iger CO₂ - Atmosphäre. Ham F-10 mit einem Gehalt von 30% fetalem Kälberserum wurde als Nährmedium zugesetzt.

Bei 7 dieser Fälle stand uns Fruchtwasser aus der 12.-28. Schwangerschaftswoche zur Verfügung, es waren somit günstige Züchtungsvoraussetzungen gegeben (siehe Abb. 1). Trotzdem konnte mit der beschriebenen Methode zunächst kein Erfolg erzielt werden. Als Ursachen dafür sind folgende Faktoren zu nennen:

1) Verunreinigung

5 Kulturen wurden verworfen wegen bakterieller Kontamination während des Fw-Transportes und der Zellzüchtung.

2) Zu wenig lebende Zellen im Verhältnis zur Gesamtzellzahl.

Dieser Punkt war - entsprechend der Abb. 1 - möglicherweise bedeutend bei den Versuchen mit Fruchtwasser aus der 8.-11. Schwangerschaftswoche (kaum lebende Zellen) und der 28.-36. Schwangerschaftswoche (ungünstiges Verhältnis zwischen lebenden Zellen und Gesamtzellmenge).

3) Unsicherheit in der Methode und fehlende Erfahrung im Umgang mit züchtungsempfindlichen Amnionzellen.

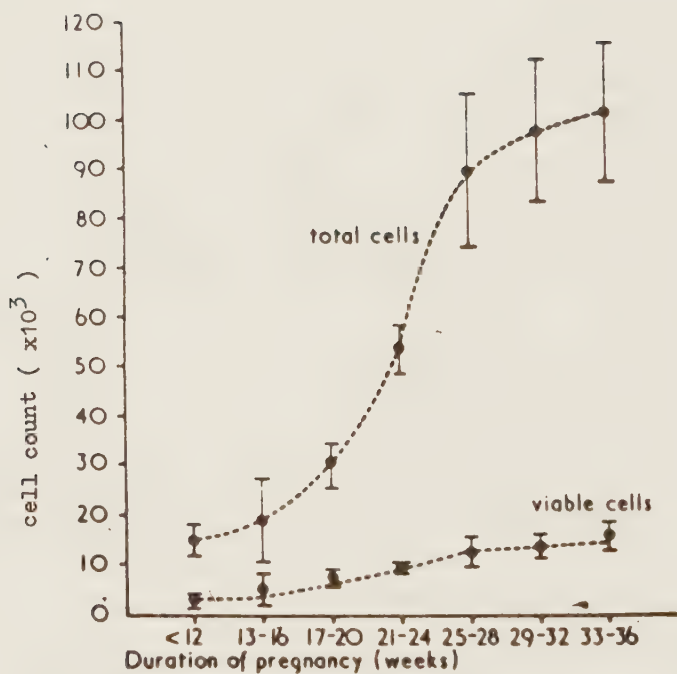


Abb. 1: Die Gesamtzahl der Zellen in Amnionflüssigkeit steigt während der Schwangerschaft in S-konfigurierter Linie an. Die Zahl der lebenden Zellen bleibt jedoch nahezu gleich, sodaß damit der Prozentsatz dieser Zellen abnimmt.

Aus: NELSON und EMERY (1970)

Da in diesem Punkt die Gründe nicht objektivierbar, mußten
Technik und Material vielfach variiert werden.

4.1. MATERIAL UND METHODIK

4.1.1. Variation der Fruchtwasserverarbeitung

Zunächst reduzierten wir Zeit und Umdrehungsgeschwindigkeit der Zentrifugation auf 5 Minuten und 600 - 800 Umdrehungen/min., um eine mögliche Zellschädigung durch Zentrifugalkräfte zu vermeiden. Bei sichtbarem Sediment zentrifugierten wir nicht. In späteren Versuchen wurde auf die Zentrifugation immer verzichtet, um das Risiko der bakteriellen Kontamination zu vermindern. Ohne Zentrifugation ist die Zellzahl pro ml bedeutend geringer. Dennoch beweisen die auf diese Art gezüchteten Kulturen, daß die Kultivierung nur einiger vermehrungsfähiger Zellen Erfolg haben kann.

Der nächste Schritt war, das geeignete Verhältnis Fruchtwasser zu Nährmedium zu finden. Nach verschiedenen Kombinationen zeigte sich die Mischung von 50% Fruchtwasser und 50% Medium als besonders günstig, zumal bei der Amniozentese in der 12. bis 16. Schwangerschaftswoche häufig nur wenig Fruchtwasser gewonnen werden kann. 3 bis 5 ml Fruchtwasser sind ausreichend zum Ansatz mehrerer Parallelkulturen, die absolut notwendig sind, da der Verlust einer Kultur häufig ist, und die Diagnose aus mindestens zwei verschiedenen Kulturansätzen gesichert werden muß.

4.1.2. Variation der Kulturgefäße

Die primäre Forderung, die an die Qualität des verwendeten Materials besteht, ist seine Atoxizität gegenüber lebenden Zellen. Es dürfen von dem Gefäß keine Substanzen abgegeben werden, die die Zusammensetzung des Mediums ungünstig beeinflussen. Die Substrate Glas, Plastik und Gummi schienen diese Voraussetzung weitgehend zu erfüllen.

So wurden während der Vorversuche Transportgefäße wie Zentrifugierröhrchen und Pipetten aus Glas verwendet. Da Glas durch seine negative Oberflächenladung eine Zellhaftung begünstigt und damit einen Zellverlust verursacht, erwies es sich für diesen Zweck als ungeeignet.

Wir gingen dazu über, steril verpackte Einmalpipetten und - zentrifugierröhrchen aus Plastik zu gebrauchen und stellten fest, daß durch seine reaktionsträge Oberfläche ein Zellverlust weitgehend vermieden wurde. Zudem vereinfachte dies den Präparationsgang bei optimalen sterilen Kautelen.

Kultivationsgefäße aus Plastik besitzen ideale Züchtungseigenschaften: Atoxizität, hohes Maß an Sterilität durch Einmalgebrauch und gute optische Eigenschaften. Dennoch bewährte sich das offene System der Plastik-Petri-Schalen in unserem Labor nicht. Es bot zu viele Ansatzpunkte für eine bakterielle Verunreinigung.

Daher begannen wir, die Kulturen in verschließbaren Gefäßen aus Glas (Leighton-Tubes, Vierkantflaschen) und Plastik (Falcon Tissue Culture Flask: T-30-, T-75-Flaschen) zu züchten. Bei den

Verschlußstopfen wurden nach mehreren Versuchen das Material Silicon bevorzugt, da es sich - im Gegensatz zu Gummi - beim Abflammen als temperaturunempfindlicher und unschädlich bei Berührung mit Zellen und Medium erwies.

Da Amnionzellen in diesen Gefäßen gleichermaßen gut wuchsen, bestimmte die verfügbare Fruchtwassermenge und die klinische Fragestellung das jeweilige Kulturgefäß. Um viel Zellmaterial für die biochemische Untersuchung zu gewinnen, züchteten wir diese Kulturen in Vierkant-, (Bodenfläche 45 cm^2) und T-30- (Bodenfläche 20 cm^2) bzw. T-75-Flaschen (Bodenfläche 75 cm^2) (siehe Abb. 2). Bei Kulturen, die für die Chromosomenanalyse gezüchtet wurden, hatte der Ansatz in Leighton-Tubes mit einem maximalen Füllungsvermögen von 2 ml große Vorteile:

- 1) 1 ml Fruchtwasser reicht aus für den Ansatz einer Kultur, somit können auch mit wenigen ml Fruchtwasser mehrere Parallelkulturen gezüchtet werden.
- 2) Mit der Möglichkeit, ein Deckglas einzuführen, gewinnt man zwei Kulturebenen, hat also eine Deckglaskultur und eine Reservekultur auf dem Gefäßboden zur Verfügung.
- 3) Durch die kleine Oberfläche wächst die Kultur schneller aus.
- 4) Das Zellwachstum kann besser verfolgt werden.

4.1.3. Variation der Medien

Damit Zellen in vitro wachsen und sich vermehren können ist das Züchtungsmilieu von entscheidender Bedeutung. Bestandteile dieses Milieus sind, neben der Kultivationsoberfläche,

die Züchtungstemperatur, die nicht variabel bei 37°C liegt, das Medium und die Gasphase.

Anfangs bereitete es große Schwierigkeiten, das extrazelluläre Milieu zu definieren und essentielle Wachstumsfaktoren zu finden, was letztlich zu standardisierten Versuchsbedingungen und reproduzierbaren Untersuchungen führen sollte. Es wurden mehrere Medien - Mc Coy 5a, TCM 199, NCTC 109, Ham F-10, Fruchtwasser - mit unterschiedlichen Serenkombinationen - 5-40% - und wachstumsstimulierende Zusätze - Glutamin, Insulin - getestet (siehe Tab. 2). Versuche, das reine Fruchtwasser als Nährmedium zu verwenden, bestätigten die von GRAY et al. (1971) beschriebenen Erfolge nicht. Bei Zusatz von fetalem Kälberserum zum Nährmedium kam es zu gutem Zellwachstum. Dies erklärt sich durch seinen Einfluß auf Haftung, Ernährung und Wachstum der Zellen, sowie durch Pufferung des Mediums. Es stellte sich jedoch heraus, daß niedrige Konzentrationen (unter 10%) unwirksam sind und zu hohe (über 30%) eine toxische Wirkung auf das Zellwachstum ausüben. Alle anderen Zusätze zeigten weder einen wachstumsfördernden noch wachstumshemmenden Effekt. Zum Schutz vor Kontamination hielten wir uns an die gebräuchliche Menge Antibiotica in Form einer antibiotisch-antimykotischen Lösung. Mit 5 der getesteten Medien gelang nur eine unzureichende Züchtung (Tab. 2). Als Medium mit den besten Wachstumsergebnissen erwies sich Ham F-10 in Kombination mit 30% fetalem Kälberserum.

Neben der idealen Zusammensetzung des Mediums wurde der pH-Wert als entscheidender Faktor für das Zellwachstum gewertet.

- 1) Fruchtwasser
- 2) MEM + 30% fetales Kälberserum
- 3) Mc Coy 5a + 30% fetales Kälberserum
- 4) TC M 199 + 30% fetales Kälberserum
- 5) NCTC Hepes + 30% fetales Kälberserum
- 6) Ham F-10 + 5 - 40% fetales Kälberserum + Insulin
- 7) Ham F-10 + 30% fetales Kälberserum + Glutamin
- 8) 50% Fruchtwasser + 50% Ham F-10 (mit 30% fetalem Kälberserum)

Tab. 2 : Getestete Kulturmedien. Mit den unter Punkt 1 - 5 genannten Medien gelang nur eine unzureichende Züchtung von Amnionzellen.

Der geeignete Bereich liegt bei 7,0 bis 7,8 und ist abhängig von der Natrium-Bicarbonat-Konzentration im Medium, der Pufferfähigkeit des Serums und der Gasphase im Kultivationsgefäß.

Das Medium gibt in ungünstigem Gasmilieu CO_2 ab und wird alkalisch; der pH kann dabei den Wert 8 weit übersteigen. Da bei der Züchtung von Amnionzellen das Kultivationsinokulum niedrig ist, gelingt es den Zellen - besonders im Stadium des beginnenden Wachstums - nicht, durch ihren Metabolismus den pH-Wert zu normalisieren. Während das saure Milieu relativ gut toleriert wird, führt eine fortbestehende Alkalose zum Absterben der Zellen. Deshalb ist es erforderlich, die Atmosphäre über dem Medium zu kontrollieren. Dies geschieht durch ein optimales Luft/ CO_2 -Verhältnis und eine entsprechend niedrige Menge NaHCO_3 im Medium. So wird mit der Zugabe von 1,2 ml einer 10% igen NaHCO_3 -Lösung der pH-Wert von 100 ml Medium auf 7,4 eingestellt.

0,35 ml einer 0,2 %igen Phenolrot-Lösung auf 100 ml dienen als Indikator und färben das Medium orange. Der Umschlag der Mediumfarbe nach violett entspricht dem basischen Milieu mit einem pH von über 8 und weist auf mangelnde CO_2 -Begasung oder fehlendes Zellwachstum hin. Der Farbwechsel nach gelb zeigt den sauren Bereich an und erlaubt Rückschlüsse auf überschießende Begasung bzw. gutes Zellwachstum.

Die während der ersten Versuchsphase praktizierte direkte CO_2 -Begasung der Kultivationsgefäße nach Ansatz und Mediumwechsel brachte keinen Erfolg. Häufige Kontrollen zeigten extreme pH-Schwankungen an mit Werten um 6,5 kurz nach der Begasung, die

dann während der Inkubationszeit auf über 8 anstiegen. Offensichtlich sind konstante äußere Bedingungen - besonders in der ersten Wachstumsphase - entscheidend.

Mit der ständigen CO₂-Begasung im Inkubator war die Voraussetzung gegeben für eine konstante Gasdiffusion durch die porösen Stopfen. pH-Änderungen wurden nur mehr bei Kulturen mit großer Teilungsrate beobachtet und gaben Anlaß für den baldigen Mediumwechsel.

4.1.4. Versuche zur frühzeitigen und verbesserten Chromosomenpräparation

Nachdem die Technik der Amnionzellzüchtung mit gutem Erfolg entwickelt worden war, galt es, möglichst früh nach Züchtungsbeginn die Chromosomen zu analysieren.

Die erste Wachstumsphase wird von der Teilungstendenz der Zellen bestimmt und ist kaum beeinflussbar. Ansatzpunkte zur Beschleunigung des Arbeitsganges bietet das Stadium des optimalen Zellwachstums. Zu diesem Zeitpunkt wird subkultiviert, das heißt, daß die Zellen mit Trypsin von dem Gefäßboden gelöst, und - entsprechend ihrer Menge - in mehreren Gefäßen neu angesetzt werden. Die Chromosomenanalyse erfolgt dann an den Zellen der erfolgreichen Subkultur (siehe Abb. 3).

Mit Hilfe der primären Deckglasmethode war es möglich, diesen Präparationsschritt zu überspringen. Beim Kulturansatz werden einige Leighton-Tubes mit Deckgläsern versehen, sodaß Zellen auch auf der Lamelle auswachsen. Ist das Deckglas zu unge-

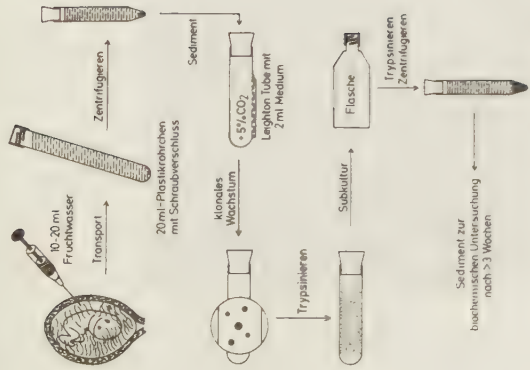


Abb. 2: Bei der modifizierten Technik wird auf Zentrifugation verzichtet.

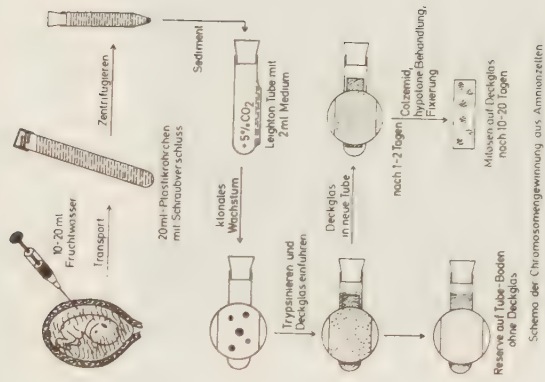


Abb. 3: Bei der modifizierten Technik wird auf Zentrifugation und Trypsinierung verzichtet. Die Chromosomenpräparation erfolgt an Zellen der primären Deckglaskultur.

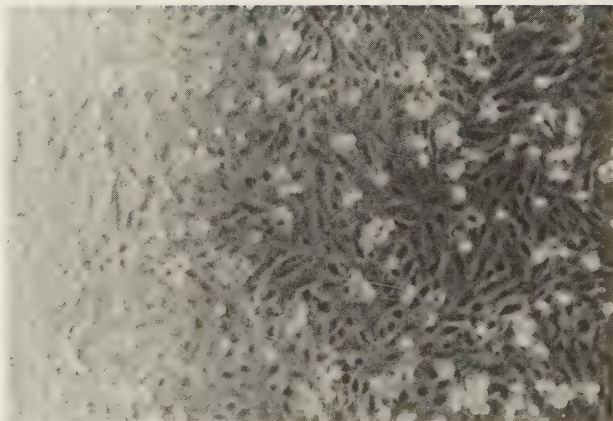


Abb.4: Mitosen (helle runde Körperchen)
einer primären Deckglaskultur.
Vitalbeobachtung (Phasenkontrast, 50-fache
Vergrößerung).

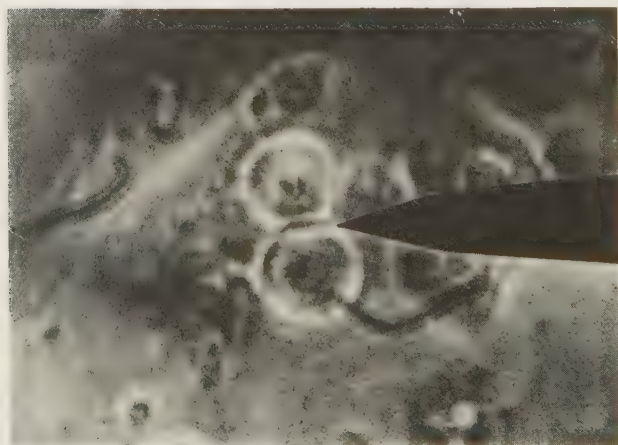


Abb.5: Abgeschlossene mitotische Zell-
teilung.

fähr 2/3 bewachsen, folgt die direkte Chromosomenpräparation der Deckglaskultur. Mit dieser Methode kann die Diagnose bei gutem Zellwachstum und erfolgreicher Chromosomenpräparation nach 8-14 Tagen feststehen (siehe Abb. 3). Die Zahl der Mitosen in unseren Präparationen lag meist über 30. Eine solch hohe Mitoserate ist eine wesentliche Forderung, die an präinatale cytogenetische Untersuchungen gestellt werden muß (Abb. 4 und 5).

Mehrere mißglückte Präparationsversuche zeigten jedoch, daß der Erfolg nicht nur von der Anzahl der Mitosen bestimmt wird, sondern oft mehr noch von dem sorgfältigen Vorgehen bei der Präparation.

Der Präparationsgang soll im Folgenden erklärt werden:

Die mit Colchizin vorbehandelte Deckglaskultur wird mit der Zellseite nach oben in eine der drei Kammern einer dreigeteilten Petrischale gelegt, die 1 ml einer warmen hypotonen Schocklösung (0,17% NaCl) enthalten. 3 ml Restschock werden tropfenweise auf der Lamelle verteilt, bis sie spannungsfrei von Flüssigkeit bedeckt ist. Während der 30 Minuten im Inkubator quellen die Zellkerne im hypotonen Milieu und die Chromosomen breiten sich aus. Es folgt die Fixierung der Mitosen durch die kalte Fixierlösung. Dabei wird die Petrischale mit dem Kammerkreuz genau unter den Ausfluß einer 50 ml Fixierlösung enthaltenden Bürette gestellt. Die Flüssigkeit läßt man mit einer Geschwindigkeit von 12 ml in 15 Minuten auf den Mittelpunkt des Kammerkreuzes tropfen und gleichmäßig in alle

drei Kammern fließen. Nach jeweils 12 ml wird die Flüssigkeit vorsichtig abgesaugt, wobei die Lamelle stets feucht bleiben muß. Nach dem 4. Absaugen läßt man die Burette rasch leer laufen und spült das Deckglas nach 15 Minuten in frischer Fixierlösung. Anschließend wird es luftgetrocknet, begutachtet, gefärbt und ausgewertet.

Die Ursache für viele mißglückte Präparationen lag vermutlich in der Anfangsphase der Fixierung: Chromosomenverluste oder auch Abschwemmen nahezu aller Mitosen konnte nur durch zu rasches Einströmen der Fixierlösung verbunden mit Wirbelbildung erklärt werden.

So versuchten wir mit Hilfe pyramidenförmig gebogener Vorrichtungen aus feinem Drahtgeflecht oder Filterpapier die Tropfhöhe zu verringern und den Weg in die Kammern der Petrischale abzuflachen. Keiner der Versuche bedeutete eine signifikante Verbesserung der Methode, da die Wirbelbildung beim Einströmen der Fixierlösung nicht ausgeschaltet werden konnte.

Die Verbesserung der Methode gelang erst mit Hilfe U-förmig gebogener Kapillarröhrchen, die über die Trennwände gelegt, jeweils 2 Kammern miteinander verbinden. Man läßt nun die Fixierlösung in eine Kammer einfließen. Die Lösung strömt, ohne Wirbel zu bilden, konstant über mehrere Verbindungsstücke in die Kammer, in der sich die Deckglaskultur befindet. Aus dem 3. Teil wird die einlaufende Lösung mit einer Wasserstrahlpumpe abgesaugt. Damit kommt es zu einem langsamen Dauerstrom frischer Fixierlösung und einer vorsichtigen Fixierung der Mitosen.

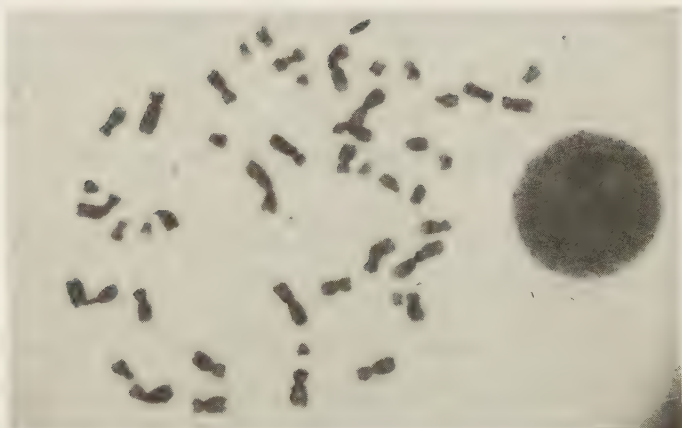


Abb. 6: Metaphasenplatte einer primären Deckglaskultur.
(Giemsa-Färbung, 1000-fache Vergrößerung)

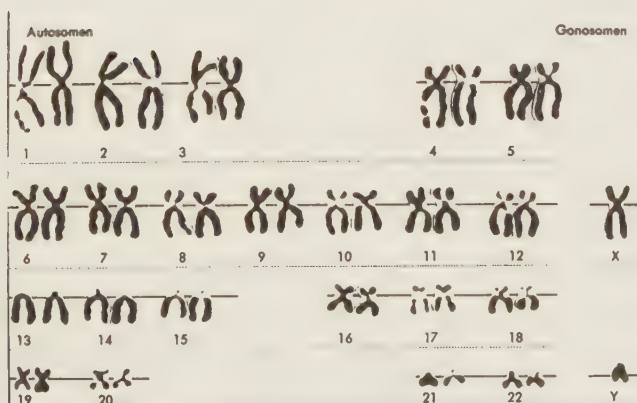


Abb. 7: Geordnetes Karyogramm eines gesunden Knaben.

Pränatale Diagnostik in der 18. Schwangerschaftswoche - Fall A7.

Mit dieser Methode lassen sich - in Abhängigkeit von Kultur- und Präparationsqualität - gut analysierbare Chromosomensätze darstellen (Abb. 6 und 7).

4.1.5. Beschreibung der modifizierten Methode

Im folgenden soll die von uns erarbeitete Methode der Zellzucht und Chromosomenpräparation beschrieben werden:

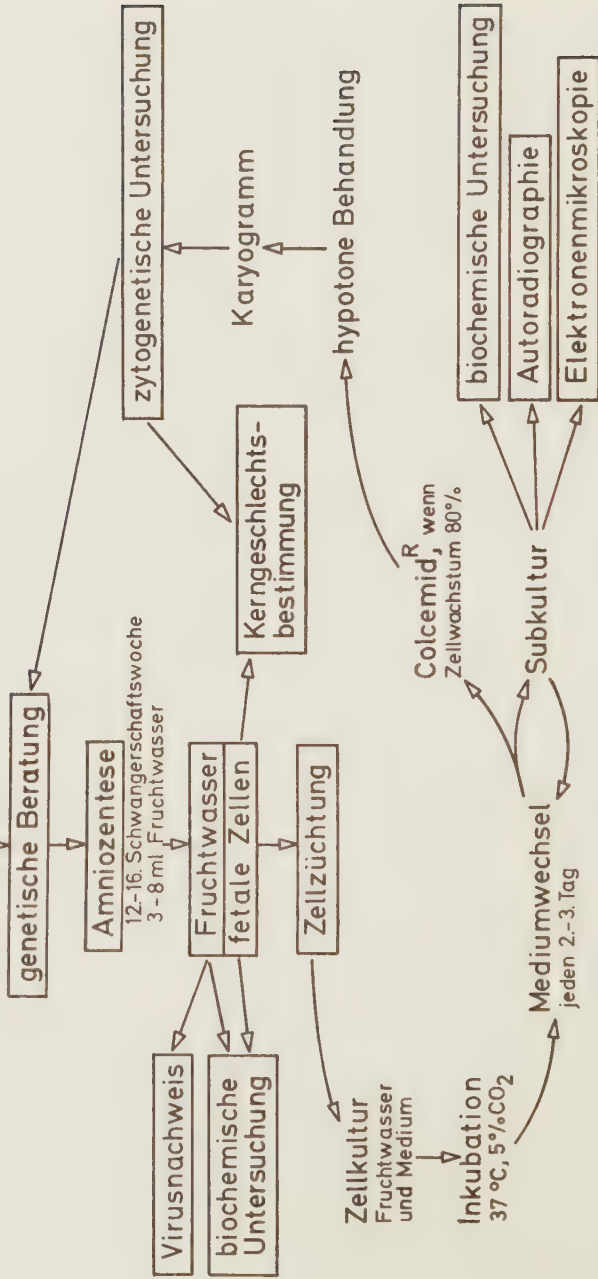
Zu 1ml Fruchtwasser gibt man 1 ml Ham F-10-Medium, das 30% fetales Kälberserum, NaHCO_3 (1,2 ml einer 10 %igen Lösung) und eine Lösung von Penicillin (100E/ml), Streptomycin (100 $\mu\text{g/ml}$) und Fungizone (0,25 $\mu\text{g/ml}$) enthält. Die Mischung wird in einem Leighton-Tube mit einer Bodenfläche von etwa 7 cm^2 bei 37°C in einer Atmosphäre von 5% CO_2 inkubiert. 2 mal pro Woche wird das Medium gewechselt. Beim ersten Wechsel wird das alte Medium mit den noch flottierenden Zellen in einem neuen Tube angesetzt. Auf diese Weise erhält man eine Reservekultur, die manchmal noch ein gutes Wachstum aufweist.

Sobald ungefähr 70% der Bodenfläche von Zellen bedeckt sind, wird das Deckglas samt Medium in ein weiteres Leighton-Tube gebracht und 1,0 $\mu\text{g/ml}$ Colcemid^R für 4 bis 5 Stunden zugegeben. Die Zellen, die auf dem Boden des ursprünglichen Tubes wachsen, werden mit neuem Medium gefüttert und weiter inkubiert. Nach der Colcemidbehandlung wird das Deckglas in eine Petrischale gelegt, sorgfältig mit hypotoner, warmer 1,17 %iger NaCl-Lösung bedeckt und während 20 Minuten bei 37°C inkubiert. Zur Fixierung wird die hypotone Lösung ersetzt durch einen

langsamen Strom einer Mischung von Eisessig und Methanol (1:3) bei 4°C (die Bürettenmethode wird in Kapitel 4.1.4. eingehend beschrieben). Nach einem letzten Bad in einer frisch zubereiteten Fixiermischung wird das Deckglas luftgetrocknet und ist bereit zur Färbung.

Risiko - Schwangerschaft

- Chromosomenaberrationen:
Mutter älter als 35 Jahre
Wiederholungsrisiko M. Down
Familiäre Translokation
- X-chromosomal - rezessiv vererbte Krankheiten
- Metabolische Erkrankungen



Schema des Ablaufs einer pränatalen Untersuchung und der verschiedenen Möglichkeiten, Fruchtwasser und Amnionzellen zur Diagnostik von Erbkrankheiten zu benutzen.

4.2. Entwicklung und Anwendung der modifizierten Methode

In Tab. 3 sind die Ergebnisse von 15 Kulturversuchen zusammengefaßt. Die Fruchtwassermenge betrug 2 bis 20 ml und wurde ausschließlich dazu verwandt, die Technik der Amnionzellzüchtung zu entwickeln und zu üben. Die transabdominalen Fruchtwasserpunktionen wurden abhängig von der Indikation zu verschiedenen Zeitpunkten der Schwangerschaft durchgeführt: In 11 Fällen erfolgte die Amniozentese vor der Interruptio aus medizinischer Indikation in der 12. bis 22. Schwangerschaftswoche, in 3 Fällen von Rh-Inkompatibilität setzten wir Fruchtwasser der 28. bis 37. Woche an. Eine Probe wurde während der Operation einer extrauterinen Gravidität in der 16. Schwangerschaftswoche entnommen.

Bei den Fällen AO 14 bis 16 wurden in vielen Parallelansätzen die in Kapitel 4.1. besprochenen Modifikationen erarbeitet. Das erklärt, daß diese Versuche, trotz anfänglichen Wachstums, ohne Erfolg beendet werden mußten. Als erfolgreich wurde eine Kultur nur bezeichnet, wenn man über das beginnende Zellwachstum hinaus eine zunehmende Zellvermehrung beobachtete. Entsprechend dieser Definition wurden in 10 Fällen erfolgreich Zellen gezüchtet, bei 9 Kulturen konnten Karyogramme gewonnen werden. Dabei ergaben sich weder numerische, noch signifikant strukturelle Chromosomenaberrationen. Kultur AO 16 b zeigte zwar ein gutes Züchtungsergebnis, doch mißlang die Chromosomenpräparation, die in diesem Versuchsstadium noch nicht ausreichend erprobt war. Erfolglos wurden die Kulturen AO 17, 23, 24 gezüchtet. Als Ursachen waren objektivierbar: Zu wenig

Fall-Nr.	Indikation	SSWO ⁺	Ansätze	beginnendes Zellwachstum (Tage nach Ansatz)	Chromosomen- präparation (Tage nach Ansatz)	Karyotyp	Bemerkung
A014	Interruptio nach Radium-Gold-Th.	18	10	7	-	-	-
A015	Interruptio mit med. Indikation	22	4	3	-	-	Bakterielle Konta- mination
A016a	"	19	18	2	-	-	-
A016b	"	19	2	2	23	-	-
A017	Extrauterin-Gra- vidität	4	2	-	-	-	zu wenig lebende Zellen
A018	Interruptio mit med. Indikation	16	5	4	11	46 XX	-
A019	"	15	8	3	27	46 XY	-
A020	"	16	4	2	25	46 XY	-
A021	"	18	5	1	34	46 XX	blutiges Frucht- wasser
A022	"	12	3	3	20	46 XY	-
A023	"	21	5	-	-	-	stark blutiges Fruchtwasser
A024	Rh-Inkompatibili- tät	37	3	-	-	-	hoher Gehalt an Bilirubin
A025	"	28	6	4	16	46 XY	-
A026	Interruptio mit med. Indikation	14	4	2	36	46 XY	-
A027	Rh-Inkompatibili- tät	33	3	6	17	46 XY	-
A028	Interruptio mit med. Indikation	20	5	3	36	46 XX	-

SSWO = Schwangerschaftswoche

Tab. 3: Übungsfälle, mit welchen die modifizierte Methode der Amnionzellzüchtung und Chromosomen-
präparation entwickelt und erprobt wurde.

lebende Zellen (4. Schwangerschaftswoche), hoher Gehalt an mütterlichen Erythrozyten (Funktion der Placenta) und Bilirubin (Rh-Inkompatibilität).

Die klinischen Daten der pränatalen Untersuchung werden in Tab. 4 demonstriert. Es dominieren die beiden Gruppen der Frauen, die von einem stark über dem Bevölkerungsdurchschnitt liegenden Risiko bedroht sind, Kinder mit Chromosomenanomalien zu bekommen: Ältere Frauen, besonders über 40 Jahre (A5, A6, A7) und Frauen, die schon ein Kind mit Trisomie 21 geboren haben (A4, A8). Es besteht jedoch nicht nur ein Zusammenhang zwischen mütterlichem Alter und Trisomie 21, sondern dies gilt auch für Trisomie 13 und 18, für das Klinefelter- Syndrom XXY (A6) und das XXX-Syndrom.

Bei den Fällen A4 und A8 wurde auf Grund der oben genannten Indikationen die Amniozentese in der 14.- 18. Schwangerschaftswoche durchgeführt und die Amnionzellzüchtung mit der Chromosomenpräparation abgeschlossen. Fünfmal erbrachte die Untersuchung unauffällige Karyogramme (zweimal 46 XX, dreimal 46 XY). Die Geburt zweier gesunder Mädchen und dreier gesunder Knaben bestätigte die Diagnose.

Im Fall A6 ergab sich der Chromosomensatz 47 XXY (Abb.9). Nach der Interruptio in der 20. Schwangerschaftswoche wurde die Diagnose durch Untersuchung des Abortmaterials gesichert. Im Fall A1 bestand die Indikation für die pränatale Untersuchung in der möglichen familiären Chromosomentranslokation - die Schwester der Patientin hat ein Kind mit Trisomie 21 geboren. Da die Patientin schwanger zur Beratung kam, konnte die

Fall-Nr.:	Alter der Mutter (Jahre)	Indikation	SSWO*	Chromosomen- präparation (Tage nach Ansatz)	Karyogramm	Bemerkung
A 1	26	Kind der Schwester mit Trisomie 21	10	-	-	zu wenig lebende Zellen
A 2	28	1. Kind an progressi- ver Muskeldystrophie gestorben	12	-	-	stark blutig tin- giertes Frucht- wasser
A 3	34	1. Kind Trisomie 21	14	39	46 XX	gesundes Mädchen geboren
A 4	31	Kind mit Trisomie 21	13	21	46 XX	gesundes Mädchen geboren
A 5	26	Hydramnion	24	20	46 XY	Verlauf unbekannt, da Pat. in Amerika lebt
A 6	40	Altersfaktor	16	14	47 XXY (Abb. 9)	Interruptio in der 20. SSWO; Diagnose am Abortmaterial gesichert
A 7	29	1. Kind Trisomie 21	18	11	46 XY	gesunder Knabe geboren

* SSWO = Schwangerschaftswoche

Tab. 4: Klinische Anwendung der modifizierten Methode zur Züchtung von Amnionzellen und Präparation der Chromosomen.

Familie erst im Anschluß an die Amniozentese chromosomal untersucht werden. Eine zweite Patientin (A2) kam zur genetischen Beratung, da ihr erstes Kind an progressiver Muskeldystrophie Typ Werdnig-Hoffmann gestorben war. Beide Male konnte wegen fehlenden Zellwachstums keine Diagnose gestellt werden. Trotzdem die Gründe bekannt waren - zu wenig vermehrungsfähiges Zellmaterial bei Punktion in der 10. Schwangerschaftswoche und massiv durch Erythrozyten kontaminiertes Fruchtwasser - wurde die Wiederholung der Amniozentese von den Müttern abgelehnt.

Die Zusammenfassung der beiden Tabellen ergibt (Tab. 5):

In 22 Fällen wurden Amnionzellkulturen nach Amniozentese in der 4.-37. Schwangerschaftswoche (Mittel 16,5) angelegt. Beginnendes Zellwachstum zeigte sich nach 1-8 Tagen (Mittel 3,5) in 19 Kulturen (86,3%), erfolgreich gezüchtet wurden 15 Kulturen (68,1%). Die Zellzüchtung konnte in 14 Fällen (66,3%) mit der Chromosomenpräparation 11-45 Tage (Mittel 17) nach Kulturansatz beendet werden, ein Versuch scheiterte an der noch nicht ausgereiften Präparationstechnik.

Als Gründe für den Kultivationsmißerfolg sind zu nennen:

1. Ungenügende Ausarbeitung und Übung der Methode: 13,6%
2. Zu wenig lebende Zellen: 9,0%
3. Blutiges Fruchtwasser: 13,6%
4. Hoher Gehalt an Bilirubin: 4,5%
5. Bakterielle Verunreinigung: 4,5%

Anzahl der Kulturen (100%)	SSWO ¹ (im Mittel)	beginnendes Zellwachstum (Tage nach Ansatz)	erfolgreiche Kulturen	mit der Chromosomenpräparation beendete Kulturen	Karyogramme
22	16 - 17	3,5	15 (68,1%)	14 (66,3%)	46 XX 46 XY 47 XX +G 47 XY +G 47 XXY
					5 - - - 1

¹SSWO = Schwangerschaftswoche

²Definition "erfolgreiche Kultur": über beginnendes Zellwachstum hinaus wird eine zunehmende Zellvermehrung beobachtet.

Tab. 5: Zusammenfassende Ergebnisse der Züchtung und Chromosomenpräparation fetaler Zellen des Fruchtwassers bis zum Abschluß der experimentellen Arbeiten.

Fall-Nr.	Alter der Mutter (Jahre)	Indikation	SSWO*	Chromosomen- präparation (Tage nach Ansatz)	Karyogramm	Bemerkung
A 8	43	Altersfaktor	15	16	46 XX	gesundes Mädchen geboren
A 9	40	Altersfaktor	16	14	46 XX	gesundes Mädchen geboren
A 10	24	1. Kind an M. Tay- Sachs gestorben	23	14	46 XX	Diagnose G _{M2} - Gangliosidose Typ 2 durch biochem. Untersuchung. Inte- ruptio in der 25. SSWO
A 11	46	Altersfaktor	16	11	46 XY	gesunder Knabe geboren
A 12	32	1. Kind Triso- mie 21	18	45	46 XY	Kind noch nicht geboren
A 13	44	Altersfaktor	17	18	46 XX	"
A 14	23	Kind der Schwester Trisomie 21	16	28	46 XY	Spontanabort nach Amniozentese
A 15	25	1. Kind Triso- mie 21	16	19	46 XX	Kind noch nicht geboren
A 16	27	habituelle Aborte	16	21	46 XX	"
A 17	37	1. Kind an M. Tay- Sachs gestorben	16	-	-	Biochemische Diag- nose: Heterozygo- tie für Variante 0; Spontanabort nach Amniozentese
A 18	30	Kind mit Trisomie 21	16	-	-	Pilzinfektion

Fall-Nr.:	Alter der Mutter (Jahre)	Indikation	SSW*	Chromosomen- präparation (Tage nach Ansatz)	Karyogramm	Bemerkung
A 19	44	Altersfaktor	16	-	-	bakterielle Kontamination; Wiederholung abgelehnt.
A 20	30	Kind mit Trisomie 21	18	28	46 XY	Wiederholung von A 18; Kind noch nicht geboren
A 21	26	1. Kind Trisomie 21	16	16	46 XY	"
A 22	33	Kind mit Trisomie 21	16	18	46 XY	"
A 23	32	1. Kind Trisomie 21	16	16	46 XX	"
A 24	38	Altersfaktor	16	23	47 XX + G (Abb. 8)	Diagnose Trisomie 21. Interruptio in der 20. SSWO
A 25	33	Kind mit Trisomie 21	17	19	46 XY	Kind noch nicht geboren.
A 26	38	2 Kinder mit Metachromatischer Leukodystrophie	21	Zellen noch nicht gezüchtet.		Diagnose an nativen Fruchtwasserzellen gestellt: Metachromatische Muskeldystrophie. Interruptio in der 21. SSWO

* SSWO = Schwangerschaftswoche

Tab. 6: Zusammenstellung der diagnostischen Fälle, die nach Abschluß der experimentellen Arbeiten mit Hilfe der modifizierten Technik in der Zeit von 1973 bis Ende 1974 untersucht wurden.

Anzahl der Kulturen (100%)	SSWO ¹ (im Mittel)	beginnendes Zellwachstum (Tage nach Ansatz)	erfolgreiche Kulturen	mit der Chromosomen- präparation beendete Kulturen	Karyogramme
19	16 - 17	3,5	16 (84%)	16 (84%)	46 XX 7 46 XY 7 47 XX +G 1 47 XY +G - 47 XXY - biochemische 2 Diagnose

¹SSWO = Schwangerschaftswoche

²Definition "erfolgreiche Kultur" : über beginnendes Zellwachstum hinaus wird eine zunehmende Zellvermehrung beobachtet.

Tab. 7: Ergebnisse der Amnionzellzüchtung und Chromosomenpräparation in der Zeit von 1973 bis Ende 1974

Geordnetes Karyogramm eines mongoloiden Mädchens

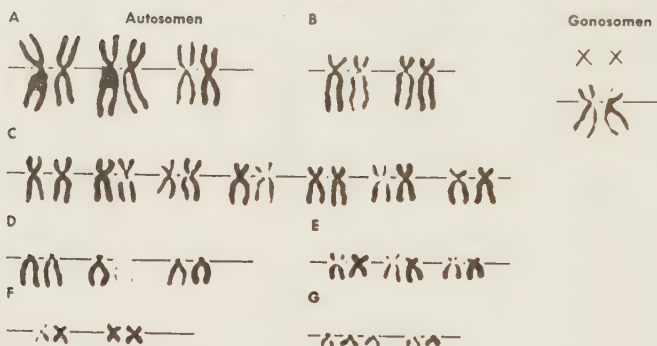


Abb. 8: Karyogramm einer pränatalen cytogenetischen Untersuchung. Diagnose: Trisomie 21 (Fall A 24).



Abb. 9: Karyogramm einer pränatalen cytogenetischen Untersuchung. Diagnose: Klinefelter-Syndrom (Fall A 6).

4.3. Beobachtungen zur Amnionzellzüchtung

Im folgenden Kapitel sollen Beobachtungen besprochen werden, die beim Zellansatz, während der Züchtung und der Chromosomenpräparation gemacht wurden.

4.3.1. Fruchtwasser

Den typischen Aspekt eines frischen Fruchtwasseransatzes zeigt Abb. 10. Man erkennt neben Erythrozyten und Leukozyten, die in jedem Punkt vorhanden sind, große, blättchenförmige Zellen.

Im wesentlichen konnten 4 Zelltypen beobachtet werden:

Typ 1 : große, unregelmäßig geformte Zellen ohne Zellkerne
(siehe Abb. 10)

Typ 2 : große, unregelmäßig geformte Zellen mit pyknotischen Zellkernen (siehe Abb. 10)

Typ 3 : kleine runde Zellen mit großem Kern

Typ 4 : große polygonale, meist kernlose Zellen.

Durch Abstriche von Eihaut und Epidermis konnte nachgewiesen werden, daß die Zellen vom Typ 1 und 2 von der Epidermis des Feten und der Zelltyp 3 von der Eihaut abstammen. Die großen Zelltypen haften nicht am Boden der Kulturgefäße und werden mit dem ersten Mediumwechsel nahezu vollständig entfernt. Somit ist anzunehmen, daß nicht sie, sondern die in viel geringerer Anzahl vorhandenen kleineren Zelltypen vermehrungsfähig sind.

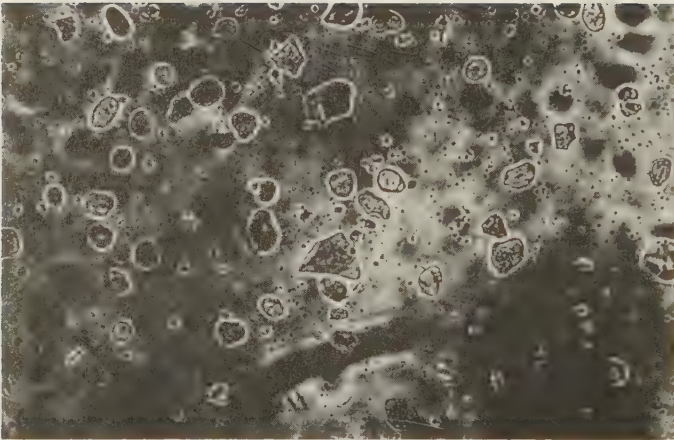


Abb. 10: Typischer Aspekt eines frischen Frucht-
wasseransatzes. Vitalbeobachtung (Phasen-
kontrast 50-fache Vergrößerung).

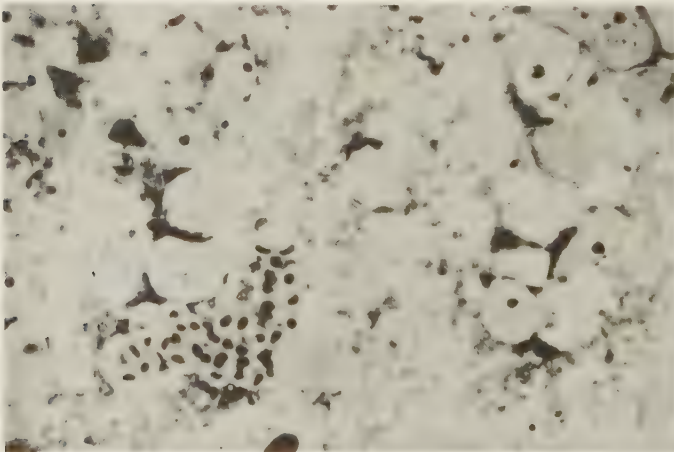


Abb. 11: Ausstrich von Fruchtwasserzellen.
Links unten ein geschlossener Verband
epitheloider Zellen.
(aus: SCHMID 1973)

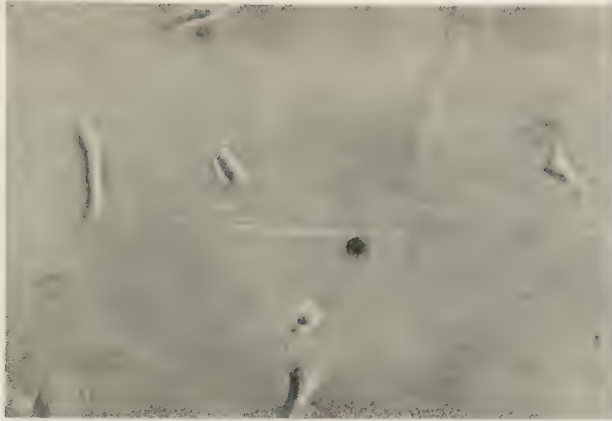


Abb. 12: Beginnendes Zellwachstum.
Vereinzelt festsitzende spindel-
förmige Zellen. Vitalbeobachtung
(Phasenkontrast, 100-fache Vergrößerung)



Abb. 13: Zwei Zellklone mit unterschiedlichem Aus-
sehen. Links spindelförmige, fibroblasten-
ähnliche Zellen, rechts kurze, gedrungene
Zellen.
(aus: SCHMID 1973)

An verschiedenen Tagen angesetzte Kulturen einer Fruchtwasserprobe, und Fruchtwasser, das erst vier Tage nach Funktion im Labor eintraf, zeigten das gleiche Wachstumsverhalten wie unmittelbare Kulturansätze. Offensichtlich behalten die Zellen ihre Teilungsfähigkeit über mehrere Tage bei. Dabei scheint die Außentemperatur bei der Aufbewahrung (von 4° - 25°C) ohne Bedeutung zu sein.

4.3.2. Zellwachstum

Gelegentlich zeigen sich nach dem ersten Tag geschlossene Verbände epithelialer Zellen in einer Kultur (Abb. 11). Trotz des homogenen Aussehens handelt es sich nicht um einen Klon - das ist eine Zellkolonie, die von einer Zelle ausgeht - sondern um ausgebreitete Epithelstücke. Diese Verbände wachsen in den ersten Tagen rasch aus, doch degenerieren sie nach ungefähr einer Woche und verschwinden.

Meist bleiben schon nach dem ersten Mediumwechsel vereinzelt feststehende spindelförmige Zellen zurück (Abb. 12). Nach einigen Tagen entwickeln sich aus diesen Zellen Kolonien, die ein individuell unterschiedliches Aussehen annehmen (Abb. 13). Die Entstehung der Zellbeete aus einer einzigen Zelle und das uniforme Bild dieses Zellverbandes zeigen, daß es sich bei der Züchtung von fetalen Zellen um einen Klonierungsvorgang handelt (Abb. 14 und 15).

Es lassen sich morphologisch vier verschiedene Zelltypen unterscheiden:

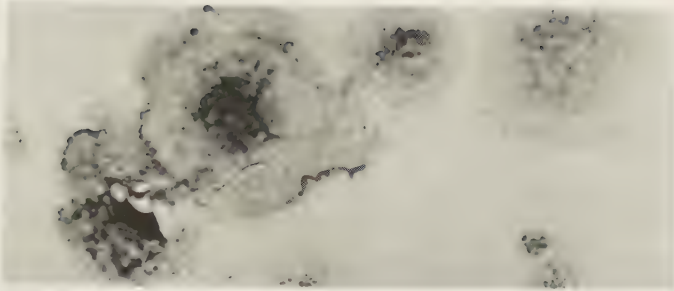


Abb. 14: Gefärbte Zellklone einer primären
Deckglaskultur.
(Giemsa-Färbung, 5-fache Vergrößerung)

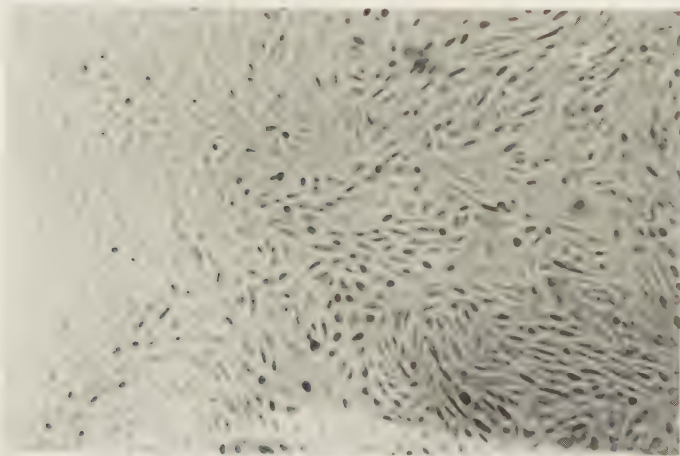


Abb. 15: Ausschnitt eines Klons aus fibroblasten-
ähnlichen Zellen.
(aus: SCHMID 1973)

- 1) schlanke Zellen, die adulten Fibroblasten ähnlich sind
- 2) epitheloide Zellen
- 3) Zellen mit plasmoiden Fortsätzen
- 4) kurze gedrungene Zellen mit fehlender Cytoplasma-Membran.

Die Zellen ohne erkennbare Cytoplasma-Membran konnten durch Vergleich mit direkt von Eihaut gezüchteten Kulturen als Eihautzellen identifiziert werden. Die fibroblastenähnlichen Zellen dürften vom Bindegewebe der Eihaut abstammen, die epitheloiden Zellen vom Mund-, Nasen-, Rachenraum, Urogenital- und Analtrakt. Die Zellen mit den plasmoiden Fortsätzen stehen wohl den Bindegewebszellen nahe.

Die Anzahl der Klone in einem Leighton-Tube schwankt zwischen 1 und 10, was vermutlich der Anzahl vermehrungsfähiger Zellen im Kulturansatz entspricht. Klone mit fibroblastenähnlichen Zellen sind dabei häufiger, als die des epitheloiden Typs.

Beobachtet man in einer Primärkultur mehrere Klone verschiedener Zellart, so fällt auf, daß nach einer bestimmten Kultivierungszeit in der Peripherie eines epitheloiden Klons die Zelldichte abnimmt und Zellen mit mehreren gelappten Kernen auftreten (Abb. 16). Häufiger noch wandeln sich die Grenzbezirke dieser Klone fibroblastisch um (Abb. 17). Nach der ersten Subkultivierung vermischen sich die Zelltypen und die schlanken Fibroblasten beherrschen das Zellbild. Somit scheint, daß Änderungen des Zelltyps in Amnionzellkulturen vorkommen und die fetalen Fibroblasten unter den gegebenen Kulturbedingungen einen Vorteil gegenüber allen anderen Zellarten besitzen.

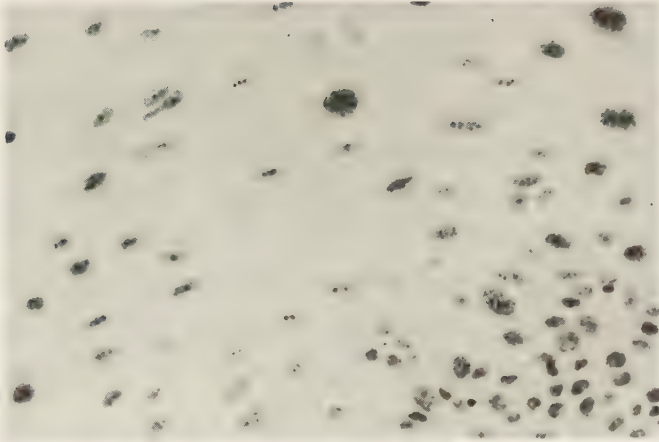


Abb. 16: Epitheloider Zellklon mit Umwandlungszone.
(aus: SCHMID 1973)

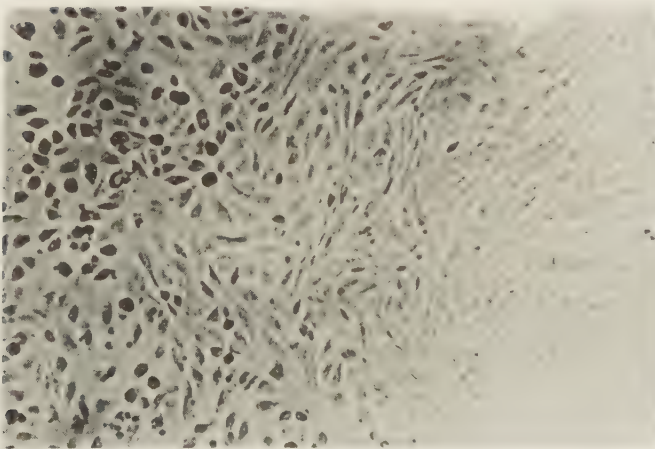


Abb. 17: Fibroblastische Umwandlung in der Peripherie eines epitheloiden Zellklons.
Vitalbeobachtung (Phasenkontrast, 50- fache Vergrößerung)

Selten werden beim Ansatz einer Fruchtwasserprobe mütterliche Gewebestücke beobachtet. Das Wachstum der Erwachsenenfibroblasten unterscheidet sich charakteristisch von der klonalen Entwicklung fetaler Zellen. Nach 8-10 Tagen beginnen Zellen an verschiedenen Stellen des Explantats zunächst in einer Ebene zu wachsen und bilden dabei einen Hof um das Gewebestück. Später breiten sie sich rasch aus und es entstehen übereinanderliegende Zellschichten. Auch wenn frühzeitig nach dem Zellan-satz schnelles Fibroblastenwachstum auftritt, muß an die Beimischung weniger mütterlicher Zellen zum Fruchtwasser gedacht werden.

Um Fehldiagnosen zu vermeiden, müssen folgende Unterscheidungsmerkmale zwischen fetalen und mütterlichen Fibroblasten genau beobachtet werden:

1. Morphologie

Die Erwachsenenfibroblasten besitzen einen sehr langen und schmalen, spindelförmigen Zelleib. Fetale Fibroblasten sind kürzer und wirken gedrungener.

2. Reaktion auf Trypsin

Erwachsenenfibroblasten sind relativ empfindlich gegenüber Trypsin, während fetale Fibroblasten sich erst nach längerer Trypsinwirkung abrunden und vom Gefäßboden lösen.

3. Chromosomenpräparation

Die Chromosomendarstellung der Erwachsenenfibroblasten gelingt mit der Deckglasmethode nicht, oder führt nur zu sehr schlechten Ergebnissen.

4.3.3. Zytogenetik

Viele Autoren berichten über Aneuploidien in ihren Präparaten. Schon KLINGER et al. (1960) konnte nachweisen, daß die Eihautzellen zur Tetraploidie neigen. Wir beobachteten in unseren Präparaten weder vermehrte Aneu-, noch Polyploidien. Eine mäßig steigende Anzahl an Tetraploidien fiel nur bei Kulturen auf, die häufig subkultiviert worden waren. Die Erklärung liegt vermutlich darin, daß jede Präparationstechnik Mitosen vorwiegend eines Zelltyps darstellt. Da mit unserer Methode in der Mehrzahl Mitosen bevorzugt ausgewählt werden, die numerisch nicht von der Norm abweichen, ist daraus zu schließen, daß die betroffenen Zellen nicht von der Eihaut abstammen.

Ebenso auffällig war, daß bei der beschriebenen Präparationstechnik (Kapitel 4.1.4.) nie Chromosomenverluste und damit artefizielle Mosaik auftraten. Diese beiden Faktoren bewiesen einen erheblichen Vorteil der Methode und ermöglichten in vielen Fällen die definitive Diagnose.

Man unterscheidet drei Arten der Zellkultur:

1. die Primärkultur
2. diploide Zellstämme und
3. Zelllinien.

Um die Amnionzellkultur systematisch einordnen zu können, sind ihre Eigenschaften mit Kriterien zu vergleichen, welche die oben genannten Zellkulturarten charakterisieren. Da die Primärkultur mit der ersten Subkultur endet, scheidet sie für diesen

Vergleich von vorneherein aus. Ebenso erfüllt die Amnionzellkultur die an eine Zelllinie gestellten Forderungen nicht:

1. Unbegrenzte Teilungsfähigkeit.

Der Zeitpunkt, zu dem die unbegrenzte Lebensfähigkeit von Zellen manifest wird, ist schwer zu bestimmen. Unsere Untersuchungen zeigten, daß Amnionzellen ihre Teilungsfähigkeit unterschiedlich lang beibehalten, diese aber nach ungefähr der 6. bis 7. Subkultur ganz verlieren.

2. Regelmäßige Wachstumsrate.

Das Intervall zwischen den Mitosen blieb nur während des ersten Drittels der Kulturdauer gleich und ermöglichte eine regelmäßige Subkultivation. Im mittleren Drittel verlängerte sich der zeitliche Abstand und im letzten Drittel trat die stationäre Phase der Zellvermehrung ein.

3. Veränderter Karyotyp.

Abweichungen in der Chromosomenzahl gegenüber der Primärkultur lagen unter der Toleranzgrenze von 8%, Strukturänderungen wurden nicht beobachtet.

4. Von Ursprungszellen abweichende Morphologie.

Amnionzellen der Subkultur unterscheiden sich morphologisch von denen der Primärkultur. Die epitheloiden Zellen werden fibroblastenähnlich. Bei diesen und den fetalen Fibroblasten nimmt die Zellgröße und die Unterschiedlichkeit der Kerne in Ausmaß und Form zu. Auch mehrkernige Zellen treten auf.

5. Verlust spezifischer Funktionen.

Es wurden biochemische Untersuchungen an Amnionzellen der 3.-5. Subkultur durchgeführt. Die Ergebnisse zeigten, daß

zu diesem Zeitpunkt hochdifferenzierte Leistungen von den Zellen erbracht wurden. Ob es nach längerer Kultivationsdauer zu einer Verminderung oder zum Verlust der spezifischen Funktionen kommt, muß durch weitere Experimente geklärt werden.

(Gliederung nach MAUSBERGER 1971).

Die Amnionzellkultur beginnt mit der Primärkultur und kann über längere Zeit kultiviert werden. Dabei durchläuft sie mehrere Passagen, ihre Lebensdauer jedoch ist in vitro begrenzt. Die Amnionzellen behalten im wesentlichen den diploiden Chromosomensatz bei; der Anteil der heteroploiden Zellen übersteigt nicht 8%. Entsprechend der angeführten Kriterien ist die Amnionzellkultur in die Gruppe der diploiden Zellstämme einzuordnen.

5. DISKUSSION

Das Ergebnis der vorliegenden Arbeit ist die Entwicklung einer reproduzierbaren Methode der Amnionzellzüchtung und Chromosomenpräparation. Sorgfalt bei der Zellarbeit, hoher Gehalt an lebenden Zellen im Fruchtwasservolumen und geringer Grad an Beimischung von Blut und anderen Bestandteilen hält HAHNEMANN (1972) für die entscheidenden Faktoren des Kulturerfolgs. Es zeigte sich jedoch, daß diese Forderungen Grundvoraussetzungen sind und der Erfahrung und Übung bei Umgang mit Zellen, Material und Methode größere Bedeutung zukommt. Darin lag vermutlich die Ursache für die Mißerfolge unserer ersten Versuche.

Zellzahl: Die Gesamtzahl der Zellen in der Amnionflüssigkeit ist abhängig von der Fruchtwassermenge, die bei der Amniozentese gewonnen werden kann und der Zellzahl in 1 ml Flüssigkeit. HAHNEMANN (1972) stellte in seinen Studien fest, daß nach der 12. Schwangerschaftswoche, möglicherweise erst nach der 14./15. Woche ausreichend Zellen für eine zuverlässige Zellkultur zur Verfügung stehen. WAHLSTRÖM et al. (1970) und NELSON et al. (1970) haben ähnliche Ergebnisse publiziert. NELSON et al. (1970) fand 25% lebende Zellen vor der 20. Schwangerschaftswoche und nur 10-15% danach, bezogen auf die Gesamtzellzahl von 100700 und 303700 in ml. GERBIE et al. (1971) und VALENTI et al. (1969) postulierten die 14. bis 16. Schwangerschaftswoche als optimalen Zeitpunkt für die Amniozentese. Die Mehrzahl unserer Versuche bestätigte die Ansicht der Autoren.

Fruchtwasser des 1. und 3. Schwangerschaftsdrittels wurde mit geringerem Erfolg gezüchtet. Der Grund dafür war einmal die kleine Anzahl lebender Zellen und zum anderen ein überschüssiger Anteil an toten Zellen. Die erfolgreiche Züchtung des Fruchtwassers aus der 12. und 33. Schwangerschaftswoche ist wohl als Bestätigung der Theorie zu werten, daß Kulturwachstum aus wenigen Zellen, oder auch nur einer einzigen Zelle entstehen kann (HAHNEMANN 1972).

Kontamination mit Blut: Mikroskopische Mengen von Blut wurde nahezu in allen Fruchtwasserproben beobachtet. Das Zellwachstum war dadurch nicht beeinträchtigt. Bei makroskopisch sichtbarer Blutbeimischung gelang die Kultivation in zwei von drei Fällen, ein diagnostischer Fall mußte erfolglos abgebrochen werden. Extreme Blutkontamination kann das Wachstum der Zellen stark vermindern, oder sogar vollständig unterbinden (LEE 1970). LEE (1970) beschreibt eine Methode, die durch Behandlung mit Ammoniumchlorid rote und weiße Blutkörperchen zu lysieren vermag. Dadurch reinigt er auch stark blutig tingiertes Fruchtwasser ohne die Vitalität der fetalen Zellen zu vermindern. Um den möglicherweise verhängnisvollen Abbruch einer indizierten pränatalen Untersuchung zu vermeiden, sollte diese Methode unter gegebenen Voraussetzungen praktiziert werden. Bei den eigenen Untersuchungen wurde das Verfahren nicht angewandt.

Bilirubinspiegel im Fruchtwasser: Unbedeutend für die pränatale Diagnostik in der Frühschwangerschaft ist der Gehalt an Bilirubin im Fruchtwasser von Patientinnen mit Rh-Inkompatibilität,

der erst im letzten Trimenon stark ansteigt. Bei Übungsversuchen mit Fruchtwasser aus der Spätschwangerschaft stellten wir fest, daß Bilirubin einen toxischen Effekt auf Amnionzellen ausübt und häufig den Kulturmißerfolg bewirkt. Durch die Arbeit von MINTZER (1969) fanden wir unsere Überlegung bestätigt. Genaue Untersuchungen zur Bestimmung der kritischen Grenze liegen noch nicht vor.

Kulturmethode: GRAY (1971) schreibt, daß die einfachste Kultivationstechnik ganz offensichtlich die besten Resultate erzielt. Die Autorin verzichtet beim Kulturansatz auf die Zentrifugation und verwendet das homologe bzw. heterologe Fruchtwasser als Nährmedium. Unsere Experimente ergaben, daß hohe Umdrehungsgeschwindigkeiten (1000-1500 U./Min.) bei der Zentrifugation, wie sie von CONSCIENCE (1972) und NADLER (1970) angegeben werden, eine Zellschädigung verursachen, während Geschwindigkeiten von 500-600 U./Min. das Wachstum nicht zu beeinträchtigen scheinen. Bei diesem wie bei unzentrifugiertem Fruchtwasser ist der Kulturerfolg gleichermaßen gut.

Nährmedien: Wenn auch das zellfreie Fruchtwasser nach GRAY (1971) alle für das Zellwachstum notwendigen Bestandteile enthält, zeigte es sich doch nach unserer Erfahrung als Nährmedium nicht geeignet. Wir fanden den Zusatz von fetalem Kälberserum mit seinem Einfluß auf Haftung, Ernährung und Wachstum der Zellen als unbedingt erforderlich. Andere Wachstumsstimulantien hatten keine Wirkung, was auch von NELSON et al. (1970) berichtet wird.

Jedes der von uns getesteten Medien wird in anderen Laboratorien mit gutem Erfolg verwendet. Daher ist es zweifelhaft, ob unsere Entscheidung für das Ham F-10 als einziges geeignetes Kulturmedium berechtigt ist. Es scheint vielmehr so zu sein, daß bei einer standardisierten, eingeführten Methode die Art des Nährmediums von untergeordneter Bedeutung ist.

Kulturerfolg: In ihren ersten Arbeiten berichten STEELE und BREG (1966) über 52 Kulturversuche, 12 Kulturen wurden erfolgreich gezüchtet und nur 2 mit der Chromosomenpräparation beendet. Das ergibt einen Züchtungserfolg von 23% und eine Erfolgsrate der Chromosomenpräparation von ungefähr 4%. Die Ergebnisse verschiedener Laboratorien, die mit unterschiedlichen Techniken arbeiten, verbesserten sich seit den Anfängen der Amnionzellzüchtung mehr und mehr (Tab. 1). Dabei zeigt sich, daß mit zunehmender Erfahrung die Erfolgsquoten den Bereich von 80-90% erreicht haben und diese Grenze bei optimalen Bedingungen sogar überschreiten können. Diese Entwicklung war auch aus unseren Versuchen deutlich zu ersehen. Von 22 Kulturversuchen wurden zwei Drittel (66%) mit der Darstellung der Chromosomen abgeschlossen. Nach Beendigung der experimentellen Arbeiten erzielte die entwickelte Methode einen Erfolg von über 80%.

Risikofaktoren: Abgesehen von der großen Bedeutung, die die Amnionzellzüchtung bei der Diagnostik genetisch bedingter Erkrankungen des Feten besitzt, sind ihre Grenzen und Risiken nicht zu vernachlässigen. Risikofaktoren der Methode sind die unter Umständen lange Züchtungszeit, die mögliche Kontamination

durch mütterliche Zellen und die Schwierigkeit der Diagnose bei dizygoten Zwillingen. Ein schwerwiegender Punkt bei der Entscheidung für oder gegen die Amniozentese ist die potentielle Gefahr für Mutter und Kind. BURNETT et al. (1968) sahen nach 8280 Amniozentesen nicht ein Mal den Tod der Mutter, während es neunmal zum Abort bzw. intrauterinen Fruchttod kam. Wir beobachteten nach 31 Amniozentesen 2 Aborte, bei denen ein kausaler Zusammenhang mit der vorausgegangenen Punktion nicht auszuschließen war. Noch unbekannt sind die kindlichen Spätfolgen, die nach der Amniozentese in der 14.-16. Schwangerschaftswoche auftreten können, da zu diesem Zeitpunkt die Entwicklung des Gehirns noch nicht abgeschlossen ist. Bisherige Untersuchungen lassen eine Schädigung des Kindes als unwahrscheinlich erscheinen (MURKEN 1974).

Nach dem Bericht von BURNETT und ANDERSON (1968) über Erfahrungen mit der Amniozentese im 3. Trimester und ihren seltenen Komplikationen scheint das Risiko der Punktion in dieser Zeit sehr gering zu sein und müßte, entsprechend dem relativen Hydramnion, im 2. Trimenon noch geringer sein (TERKELSEN et al. 1971). GERBIE et al. (1971) haben 408 transabdominale Amniozentesen ohne Komplikationen von Seiten der Mutter oder des Kindes im 2. Trimenon durchgeführt. Auf Grund dieser Ergebnisse ist anzunehmen, daß das Risiko sehr klein ist und nach NADLER et al (1970) unter 1% liegt. KNÖRR (1970) hält die Amniozentese bis zur 20. Schwangerschaftswoche für indiziert, wenn die Wahrscheinlichkeit für ein genetisches Leiden des Kindes größer als 1% ist.

Die Indikation für eine pränatale Chromosomenanalyse erscheint

unter folgenden Voraussetzungen gegeben:

1. Vorangegangene Geburt eines Kindes mit Trisomie 21.
Wiederholungsrisiko 1-2% (STENEL 1970).
2. Mütter über 40 Jahre. Risiko 1-2% (LILIENFELD 1969).
3. Ein Elternteil ist Träger einer balanzierten Translokation.
Je nach Art der Translokation besteht, falls die Mutter Trägerin ist, ein empirisches Risiko von ungefähr 10% für ein chromosomal nicht balanziertes Kind. Ist der Vater Träger, beträgt das empirische Risiko etwa 4%.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Es wurde eine modifizierte Technik der Amnionzellzüchtung und Chromosomenpräparation entwickelt, die sich gegenüber den in der Literatur beschriebenen Methoden als überlegen erwies.

Bei der Fruchtwasserverarbeitung verzichteten wir auf Zentrifugation, die wegen der Zellschädigung durch Zentrifugalkräfte und des Risikos der bakteriellen Kontamination problematisch erschien. Das geeignete Verhältnis zwischen Fruchtwasser und Nährmedium lag, nicht zuletzt aus technischen Gründen, bei 1 : 1.

Von den getesteten Nährmedien zeigte Ham F-10 mit Zusatz von 30% fetalem Kälberserum den besten Züchtungserfolg. Der geeignete pH-Wert lag zwischen 7,0 und 7,8. Als Transportgefäße waren steril verpackte Einmalpipetten und -zentrifugierröhrchen aus Plastik besonders geeignet, während Kulturgefäße aus Plastik (T 30-, T 75-Flaschen) wie aus Glas (Leighton-Tubes, Vierkant-Flaschen) bestanden.

Für die Darstellung gut analysierbarer Chromosomensätze aus der primären Deckglaskultur bewährte sich ein langsam über die Mitosen fließender Dauerstrom frischer Fixierlösung. Dies gelang durch die Verwendung U-förmig gebogener Kapillarröhrchen, die die Kammern einer dreigeteilten Petrischale miteinander verbanden.

Die eingehend beschriebene Methode wurde in 41 Fällen erprobt und angewandt. Die Amnionflüssigkeit stammte aus der 4.- 37. Schwangerschaftswoche. 34 Kulturen wurden erfolgreich gezüchtet, 33 Fälle konnten nach 8-45 Tagen mit der Chromosomenprä-

paration abgeschlossen werden. 7 Kulturversuche und eine Chromosomenpräparation mißlangen, die Gründe konnten meist objektiviert werden. Eine Übersicht über die Fälle wird gegeben, die nach Abschluß der Experimente mit Hilfe der erarbeiteten Methode untersucht wurden.

In 2 Fällen ergab die Untersuchung Chromosomenaberrationen: einmal einen Karyotyp 47 XXY (Fall A 6; MURKEN et al. 1974), einmal einen Karyotyp 47 XX + G (Fall A 24). Bei zwei Untersuchungen mit biochemischer Fragestellung konnte intrauterin ein homohygot erkranktes Kind diagnostiziert werden. Dabei handelte es sich um eine G_{M2} -Gangliosidose Typ 2 (Fall A 10) und um eine Metachromatische Leukodystrophie (Fall A 26).

Auch ein längeres Zeitintervall (bis zu 4 Tagen) zwischen Amniozentese und Kulturansatz beeinträchtigte die Teilungsfähigkeit der Zellen nicht.

Die Morphologie der Fruchtwasserzellen war vielfältig; mindestens 4 Zelltypen konnten unterschieden werden. Beim Wachstum der Amnionzellen handelt es sich um einen Klonierungsvorgang. Ausgehend von wenigen vitalen Zellen entwickelten sich pro Kultur durchschnittlich 5-10 Klone. Die Morphologie der Zellen in den einzelnen Klonen variierte von fibroblastenähnlichen Zellen bis zu Zellen mit epithelialem Aussehen. Die Identifikation eines Zelltyps als Abkömmling der Eihaut gelang durch Vergleich mit direkt von Eihaut gezüchteten Kulturen.

Kindliche und mütterliche Zellen konnten durch ihr spezifisches Verhalten bei Züchtung und Präparation unterschieden werden.

Der Vorteil der eigenen modifizierten Chromosomenpräparation bestand darin, daß weder Aneuploidien noch Tetraploidien, weder Chromosomenverlust noch artefizielle Mosaikbeobachtet wurden.

7. LITERATURVERZEICHNIS

Bermann, P.H., Balis, E., Dancis, J.: "A Method for Prenatal Diagnosis of Congenital Hyperuricemia".
J. Ped. 75, 488 (1969)

Bevis, D.C.A.: "The Composition of Liquor Amnii in Haemolytic Disease of the Newborn".
J. Obst. and Gynaec. 60, 244 (1953)

Burnett, R.G., Anderson, W.R.: The hazards of amniocentesis.
J. Iowa Med. Soc. 58, 130 (1968)

Butler, L.J., Reiss, H.E.: "Antenatal Detection of Chromosome Abnormalities".
J. Obst. Gynec. 77, 902 (1970)

Conscience, J.F., Schmid, W., Gysel, J., Stamm, H., Schreiner, W.: "Gewebekultur von Amnionzellen aus Fruchtwasserproben der frühen Schwangerschaft. Technische Erfahrungen und cytogenetische Resultate".
Sonderdruck aus Archiv für Genetik 45, 17 (1972)

Daniel, M.C.: Recherches sur la cytologie du liquide amniotique.
Ann. Gynéc. Obstét. 1, 466 (1904)

Emery, A.E.H.: "Antenatal Diagnosis of Genetic Disease".
From: Modern trends in Human Genetics I, 267, Butterworth London

Fairweather, D.V.J., Eskes, T.K.A.B.: "Amniotic Fluid-research and clinical application".
Excerpta medica Amsterdam (1973)

Fuchs, F., Riis, P.: Antenatal sex determination.
Nature 177, 330 (1956)

Fuchs, F., Philip, J.: Possibility of Antenatal Examination of Fetal Chromosomes.
Nord. Med. 69, 572 (1963)

Fuchs, F.: Volume of amniotic fluid at various stages of pregnancy.
Clin. Obst. and Gynaec. 9, 2 (1966)

Fuchs, F.: Genetic Information from Amniotic fluid constituents.

Clin. Obst. Gynec. 9, 565 (1966)

Gerbie, A.B., Nadler, H.L., v.Gerbie, M.: Amniocentesis in genetic counseling.

Amer. J. Obst. Gynec. (1971)

Gray, C., Davidson, R.G., Cohen, M.M.: A simplified technique for the culture of amniotic fluid cells.

J. Ped. 79, 1 (1971)

Gregson, N.M.: A Technic for Culturing Cells from Amniotic Fluid.

Lancet (1970)

Hahnemann, N.: Possibility of culturing fetal Cells at early stages of pregnancy.

Clin. Genetics 3, 286 (1972)

Hamerton, J.C.: Fetal Karyotype of Amniotic Cells without Culturing.

Lancet 1, 203 (1972)

Harzer, K., Stengl-Ruthowski, S., Albert, A., Gley, E.O., Murken, J.D., Zahn, V., Henkel, K.P.: Pränatale Diagnose der G_{M2} -Gangliosidose Typ 2 (Sandhoff's disease").

Dtsch.med. Wschr. 100, 106-108, 1975

Hughes, D.T., Rink, E.: Prenatal Diagnosis from uncultured Amniotic Fluid Cells.

Lancet 1, 270 (1972)

Jakobson, C.B., Barter, R.H.: Intrauterine Diagnosis and management of genetic defects.

Am. J. Obst. + Gynec. 99, 6 796 (1967)

Klinger, H.P.: Zitiert nach Steele und Breg (1966)

Klinger, H.P., Schwarzacher, H.G.: The sex chromatin and heterochromatin bodies in human diploid and polyploid nuclei. J. Biophys. Biochem. Cytol. 8, 345 (1960)

Knörr, K.: Die pränatale Diagnose aus der Sicht des Geburtshelfers.

(Vortrag auf der Sitzung der Kinderärztlichen Gesellschaft in München am 4.11.1970).

Lee, C.L.J., Gregson, S., Walker, S.: Elimination redblood-cells from amnioticfluid samples.

Lancet 11, 316 (1970)

Lilienfeld, A.M., Bensch, C.H.: Epidemiology of Mongolism
S. 27. The Johns Hopkins Press, Baltimore, (1969)

Makowski, E.L., Prem, K.A., Kaiser, I.H.: Detection of sex of fetuses by the Incidence of Sex Chromatin Body in Nuclei of Cells in Amniotic Fluid.

Science 123, 542 (1956)

Mausberger, B.: Aktuelle Probleme der Zellzüchtung.
Gustav Fischer Verlag Stuttgart 1971

Menees, T.O., Miller, J.D., Holly, L.E.: Amniographie: preliminary report.

Am. J. Roentgenol. 24, 363 (1930)

Milunsky, A., Littlefield, J.W.: Prenatal Genetic Diagnosis (First of three parts)

New Engl. J. Med. 283, No. 25 (1970)

Milunsky, A. et al.: Polyploidy in prenatal genet. Diagnosis.
J. Ped. 79, 303 (1971)

Milunsky, A. et al.: Amniocentesis for prenatal genetic studies.

Obst. and Gynec. 40, 104 (1972)

Milunsky, A.: The prenatal Diagnosis of Hereditary Disorders.
Charles C. Thomas Publisher Springfield, Illinois 1973

Murken, J.D.: Nachuntersuchungen von Kindern nach Amniozentese.

Vortrag bei der Tagung der Gesellschaft für Kinderheilkunde Hamburg 9.9.1974

Murken, J.D.; Stengl-Rutkowski, S., Walther, U., Westenfelder, S., Remberger, K.H., Zimmer, F.: Klinefelter's Syndrome in a Fetus.

Lancet, II, 171 (1974)

Nadler, H.L.: Antenatal Detection of Hereditary Disorders.
Pediatrics, 42, 912 (1968)

Nadler, H.L.: Prenatal Detection of Genetic Defects.
J. Pediat. 74, 132 (1969)

Nadler, H.L., Gerbie, A.B.: Role of Amniocentesis in the intra-uterine detection of genetic Disorders.
New. Engl. J. Med. 282, 596 (1970)

Nadler, H.L., Gerbie, A.B.: Present Status of Amniozentesis in Intrauterine Diagnosis of Genetic Defects.
Obst. Gynec. 38, 789 (1971)

Nadler, H.L.: Indications for Amniocentesis in the Early prenatal Detection of Genetic Disorders.
Birth Defects: Original Article Series, 7, Nr. 5 (1971)

Nadler, H.L.: Prenatal Detection of Genetic Disorders.
In: Advances in Human Genetics by Harris a. Hirschhorn
3, 1972, Plenum Press

Nelson, H.M., Emery, A.E.: Amniotic Fluid Cells; Prenatal sex prediction and culture.
British Med. J. 1, 523 (1970)

Prescott, G.H., Pernoll, M.L. et al.: A prenatal diagnosis clinic: An initial report.
Am. J. Obst. et Gynaec. 116, No. 7 (1973)

Quayle, S., Chitham, R.G., Craft, I.: Prenatal Diagnosis from Uncultured Amniotic-Fluid Cells.
Lancet 1, 269 (1972)

Riis, P., Fuchs, F.: Antenatal Determination of Faetal Sex in Prevention of Hereditary Diseases.
Lancet 2, 180 (1960)

Roberts, D.F. et al.: The genetic component in Child mortality.
Arch. Dis. Childh. 45, 33 (1970)

Roga, P., Fanard, A.: Une méthode inédite de diagnostic prénatal du sex.
Bull. Assn. Gyn. et Obst. de Langue Franc. 1, 371 (1949)

Rosa, P.A., Fanard, A.E.: A new Methode of prenatal Diagnosis of sex.
Int. J. Sexol. 4, 160 (1951)

Santesson, B. et al: Karyotyping Human Amniotic-Fluid Cells.
Lancet 2, 1067 (1969)

Scriber, Ch.R.: Screening and treatment for hereditary (metabolic) disease.
Human Genetics. Proceeding of the fourth internat. congr. of human gen. 5, 10

Serr, D.M., Sachs, L., Danson, M.: Diagnosis of sex before birth using cells from the Amniotic fluid.
Bull. Coun. Israel E, 5B, 137 (1955)

Shettles, L.B.: Nuclear morphology of Cells in Human Amniotic Fluid in Relation to the Sex of Infant.
Am. J. Obst. Gynec. 71, 834 (1956)

Sperling, K., Saling, E.: Präinatale Chromosomenanalyse mit Mosaikbefund 46 XX/ 92 XXXX.
Humangenetic 11, 139 (1971)

Steele, M.W., Breg, W.R.: Chromosome Analysis of Human Amniotic-Fluid Cells.
Lancet 1, 383 (1966)

Stene, J.: Detection of higher recurrence risk for age-dependent Chromosome abnormalities with an application to trisomy G₁ (Down's Syndrom)
Hum. Hered. 20 : 112 (1970)

Stevenson: Frequency of congenital and hereditary disease.
Brit. med. Bull. 17, 254 (1961)

Schmid, W.: Zur pränatalen Diagnose von Chromosomenanomalien. Fakten und Problematik. Schweizerische Ärztezeitung 46, 1379 (1971)

Schmid, W.: Die pränatale Diagnose von Chromosomenanomalien. Triangel, Bd. 11, Nr. 3 (1973)

Terkelsen, A.J., Petersen, B.G., Steenstrup, O.R., Jonasson, J., Lindstein, J., Zech, L.: Prenatal Diagnosis of chromosome Abnormalities.
Acta Paediat. Scand. 61: 397 (1972)

Thiede, H.A., Greasman, W.T., Metcalfe, S.: Antenatal Analysis of the Human Chromosomes.
Am. J. Obst. et Gynaec. 94, 589 (1966)

Valenti, C., Kehaty, T.: Culture of Cells Obtained by Amniocentesis.
J. Lab. and Clin. Med. 73, 355 (1969)

Wahlström, J., Prosset, A., Bartsch, F.: Viability of amniotic cells at different stages of gestation.
Lancet 11, 1037 (1970)

Walknowska, J., Conte, F.A., Grumbach, M.H.: Practical and theoretical implications of fetal/maternal lymphocyte transfer.
Lancet 1, 1119 (1969)

Mein Dank gilt Herrn Priv. Doz. Dr.med. J. D. Murken für die Überlassung des Themas und für die Unterstützung bei der Durchführung der Arbeit sowie ihrer Korrektur.

Herrn Prof. Dr.med. H. Spiess danke ich für die Übernahme des Korreferats.

Bei Herrn Dr.med. B. Nitsch bedanke ich mich für die Einführung in die experimentelle Arbeit, für seine wertvollen Anregungen zu vielen Problemen und für seine Mitarbeit bei der Durchführung der Versuche.

Allen Mitarbeitern des Labors, ganz besonders Frau Boetzelen, Frau Hahn und Herrn Dr.med. M. Gley, danke ich für die Unterstützung und Hilfe bei der experimentellen Arbeit.

Herrn Stud. med. M. Endres danke ich für die Photographien und Herrn Dipl. Ing. H.G. Tillmann für die graphische Darstellung.

LEBENS LAUF

Am 10. September 1946 wurde ich als erstes Kind des Arztes Dr.med. Johannes Götz und seiner Ehefrau Margaretha, geb. Bauer, in Fischbachau geboren.

Die Volksschule besuchte ich in Fischbachau, die höhere Schule in der Städtischen Oberrealschule Miesbach und im Städtischen Elsa-Brandström-Gymnasium München-Pasing. Dort legte ich im Juli 1966 die Reifeprüfung ab.

Mit dem Wintersemester 1966/67 begann ich das Studium der Naturwissenschaften an der Universität München und wechselte im Sommersemester 1967 zum Fach Humanmedizin über. Am 20. Juli 1973 beendete ich das Studium mit dem Staatsexamen.

Meine Medizinalassistentenzeit verbrachte ich an der Kinderpoliklinik München, in der Chirurgischen Abteilung des Knappschaftskrankenhauses Hausham und in der Inneren Abteilung des Städtischen Krankenhauses Harlaching.

Am 12. November 1974 erhielt ich die Approbation als Arzt.



